瑶药红牛膝质量控制方法研究

陈松[1]，雷沛霖[1]，黄瑞松[1*]，李运容[1]，屈信成[2]

（1. 广西国际壮医医院，南宁 530201；2. 广西中医药研究院，南宁 530022）

摘 要： 瑶药红牛膝为苋科植物柳叶牛膝(*Achyranthes longifolia*)的根及根茎，为瑶族地区习用药材，目前仅有个别省份收载有其质量控制方法。该研究对广西区内采集的 14 批红牛膝药材进行性状鉴别、显微鉴别和薄层色谱鉴别；建立红牛膝中*β*-蜕皮甾酮的 HPLC 含量测定方法，采用飞诺美 Gemini-NX C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 µm），以乙腈-水溶液（15：85）进行等度洗脱，柱温 25 ℃，流速 1.0 mL·min^{-1}，检测波长 243 nm。结果表明：（1）红牛膝药材性状、显微鉴别特征明显，显微鉴别可见栓内层、维管束、异常维管束、导管、射线细胞、草酸钙砂晶或方晶等；（2）薄层色谱分离好，*β*-蜕皮甾酮和人参皂苷 R_O 对应的斑点清晰；（3）含量测定中，*β*-蜕皮甾酮在 5.606~224.224 µg 范围内线性关系良好（r＝0.999 9），平均加样回收率分别为 97.68%，RSD 为 1.37%(n=6)；（4）14 批样品中*β*-蜕皮甾酮含量为 0.005%～0.158%，平均含量为 0.098%。该研究建立了完整的显微鉴别、薄层鉴别及含量测定方法，为合理评价红牛膝质量和临床合理用药提供科学依据。

关键词: 红牛膝，性状，显微鉴别，薄层鉴别，含量测定

中图分类号: Q946　　　　**文献标识码:** A

Quality control method for Yao medicine *Achyranthes longifolia*

CHEN Song[1], LEI Peilin[1], HUANG Ruisong[1*], LI Yunrong[1], QU Xincheng[2]

(1. *Guangxi International Zhuang Medicine Hospital*, Nanning 530201, China; 2. *Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science*, Nanning 530022, China)

Abstract: Yao medicine Hongniuxi is the root and rhizome of *Achyranthes longifolia*, which was a commonly used medicinal herb in Yao ethnic areas. Currently, only a few provinces have recorded the method for quality control of *A. longifolia*. Microscopic method and thin layer chromatography were qualitatively identified on the roots and rhizomes of 14 batches of Yao Medicine *A. longifolia* collected in Guangxi region in the standy. The content of *β*-ecdysterone was determined by High Performance Liquid Chromatography. The Phenomenex column (250mm×4.6 mm, 5 µm) was used, the mobile phase was acetonitrile-water (15:85) , the column temperature was 25 ℃, the flow rate was 1.0 mL·min^{-1}, and the detection wavelength was at 243 nm. The results were as follows: (1) The characteristics and microscopic identification methods of *A. longifolia* were obvious. Microscopic identification showed the inner layer of thrombus, vascular bundle, abnormal vascular bundle, duct, ray cell, calcium oxalate sand crystal or square crystal, etc. (2) The identification spots of *β*-ecdysterone and ginsenoside R_O thin layer chromatography are clear, and the separation effect was good. (3) The *β*-ecdysterone showed a good linear relationship within the range of 5.606−224.224 µg (r＝0.999 9), whose average recovery (n=6) was 97.68%, with the RSD of 1.37%. (4) Among 14 batches of samples, the content of *β*-ecdysterone range from 0.005% to 0.158%, with an average content of 0.098%. This study established a complete method for microscopic

---

基金项目: 广西科技厅重点研发计划项目（桂科 AB18221099）；《广西壮族自治区瑶药材质量标准（第二卷）》质量评价与标准研究项目（MZY2017004）；黄瑞松全国名老中医药专家传承工作室。

第一作者: 陈松（1983-），副主任药师，主要从事药物质量研究及民族药制剂研发，（E-mail）84946936@qq.com。

*__通信作者:__ 黄瑞松，主任药师，长期从事民族药材质量标准研究及民族药制剂研发，（E-mail）hrs3130064@163.com。

identification, thin-layer identification, and content determination, providing a scientific basis for rational evaluation of the quality of *A. longifoli*. and clinical rational drug use.

Key words: *Achyranthes longifolia,* character; microscopic identification, TLC identification, content determination

瑶药红牛膝为苋科植物柳叶牛膝(*Achyranthes longifolia*)的根及根茎，始见成书于公元 1436 年的《滇南本草》（兰茂，1959）。近代本草《中药大辞典》（南京中医药大学，2006）、《中华本草》（国家中医药管理局中华本草编委会，1999）将“柳叶牛膝”收载于“土牛膝”项下，作为土牛膝的一个基原。

红牛膝广西各地及我国南北各省均有分布，生于山坡、沟谷、村旁，庭园亦有栽培，恭城药市上常有交易（林春蕊等，2016），在广西瑶族地区使用广泛，瑶语称之为“照脑咪”。《新编中药志》（肖培根, 2002）、《广西恭城瑶族端午药市药用植物资源》（林春蕊等，2016）、《广西植物名录》（覃海宁和刘演，2010）等均对红牛膝有记载。广西恭城瑶族地区的瑶医多以根入药，瑶医认为其味苦、酸，性平，具有活血散瘀，祛风除湿，清热解毒，利尿功效，常用于治小儿感冒高热、肺炎咳嗽、尿路感染、肾炎、风湿性关节炎、腰膝酸痛、脚气水肿、闭经、产后腹痛、跌打损伤、鸡骨鲠喉、竹木刺伤、蜂蜇伤（覃迅云，2002），其疗效良好，具有较好的开发前景。

红牛膝现收载于地方标准《江西省中药饮片炮制规范》（江西省食品药品监督管理局，2009）中，其标准指标有性状、鉴别（粉末显微鉴别）、检查（水分、总灰分、酸不溶性灰分）检验项目，但缺少药材横切面、薄层色谱鉴别、含量测定等重要的定性定量检测指标。同时，红牛膝与同属植物的土牛膝（*A.bidentata*）、粗毛牛膝（*A. aspera*）、钝叶土牛膝（*A. aspera* var. *indica*）的原植物形态相似，生长环境相同，各地存在混用情况（南京中医药大学，2006）。为区分鉴别药材真伪，正确评价药材质量优劣，确保临床用药安全有效，有必要制订可有效控制瑶药红牛膝药材质量的标准，为红牛膝药材的真伪鉴别和质量评价提供法定依据。

红牛膝主要含有皂苷、生物碱、强心苷、三萜类化合物、甾体化合物、挥发油及有机酸等化学成分（国家中医药管理局中华本草编委会，1999）。其中，β-蜕皮甾酮是其主要活性成分之一，具有促进蛋白质合成（Gorelick-Feldman et al., 2008）、抗心律失常（吴旭等，2002）、抑制上皮细胞凋亡保护心肌（吴旭，2006；夏西超等，2013）、抑制血糖上升（张庆远等，2015）、通经活络、除湿镇痛等作用（王景富, 2017）；可治疗骨质疏松症（于大永等, 2011；汤样华等, 2019；赵强，2021；章喻等, 2022）。对红牛膝中β–蜕皮甾酮进行含量测定，可作为红牛膝内在质量的控制方法。本研究采集广西不同产地红牛膝样品，完善红牛膝的性状鉴别，显微特征鉴别，TLC 采用对照药材、化学对照品定性鉴别，通过 HPLC 法定量分析β-蜕皮甾酮的含量，为其药材质量标准的提高奠定基础，以更加系统、科学地评价该药材的品质。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

仪器：LC-20AT 高效液相色谱仪（岛津公司），1260 高效液相色谱仪（Agilent 科技公司）；KQ-300DB 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；XS205 电子分析天平（精度：十万分之一）（METTLER TOLEDO）；Master-S15 超纯水机（上海和泰仪器有限公司）；Olympus BH-2 生物显微镜、Olympus DP20 照相系统（日本奥林巴斯株式会社）；YOKO-ZS 薄层色谱成像仪(武汉药科新技术开发有限公司)。

试剂：β-蜕皮甾酮对照品（来源：中国食品药品检定研究院，批号：111638-201907，含量：98.3%）；人参皂苷 R_0 对照品（来源：中国食品药品检定研究院，批号：111638-201907，含量：98.3%）；乙腈（色谱纯，来源：德国 Merck 公司）；硅胶 G 板（默克化工技术（上海）有限公司，批号：HC39961356；青岛海洋化工有限公司，批号：20150312；烟台市化学工业研究所，批号：120829）；其余试剂为分析纯。

1.2 药材

红牛膝药材在广西各地共收集 14 批不同产地的样品（表 1）。其中，8 号样品制成腊叶标本（图 1），经广西中医药大学韦松基教授、广西中医药研究院黄云峰副研究员鉴定，为苋科植物柳叶牛膝（*Achyranthes longifolia*），取 8 号样品作为本研究的对照药材。

表 1　14 批红牛膝药材信息表

Table 1　Information of 14 batches of *Achyranthes longifolia*

编号 No.	采集地点 Collecting site	编号 No.	采集地点 Collecting site
1	武鸣双桥镇 Shuangqiao Town, Wuming District	8	鹿寨县平山乡 Pingshan Township, Luzhai County
2	恭城县莲花乡 Lianhua Township, Gongcheng County	9	西林县 Xilin County
3	恭城县三江乡 Sanjiang Township, Gongcheng County	10	柳州市柳江县里高乡 Ligao Township, Liujiang County, Liuzhou City
4	恭城县莲花乡 Lianhua Township, Gongcheng County	11	桂林市恭城县 Gongcheng County, Guilin City
5	恭城县平安乡 Pingan Township, Gongcheng County	12	临桂区茶洞乡 Chadong Township, Lingui District
6	凤山县乔音乡 Qiaoyin Township, Fengshan County	13	临桂区茶洞乡江底 Jiangdi, Chadong Township, Lingui District
7	凤山县城山坡上 On the hillside of Fengshan County	14	凤山县凤城镇 Fengcheng Town, Fengshan County

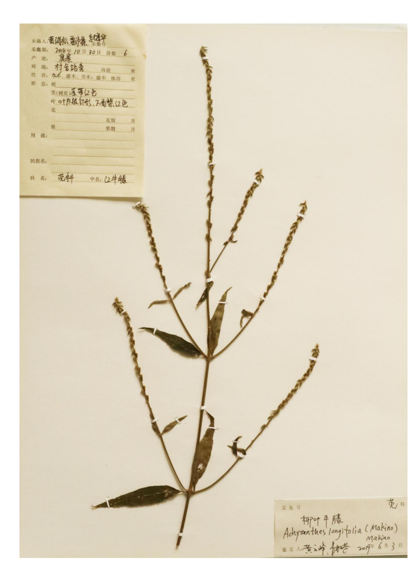


图 1　红牛膝腊叶标本图

Fig.1　Specimen of *Achyranthes longifolia*

1.3 方法

1.3.1 红牛膝的性状鉴别

对红牛膝的根及根茎的大小、形状、表面、质地、断面及气味等特征进行观察与描述。

1.3.2 红牛膝的显微鉴别

将红牛膝根经固定液固定后按石蜡切片法切片染色制片，在生物显微镜下观察红牛膝根横切面的显微特征；将红牛膝根经干燥、粉碎，过药典四号筛，取粉末少许置载玻片上，用水合氯醛透化、装片，观察粉末的显微特征。

1.3.3 红牛膝的薄层色谱鉴别

取红牛膝药材粉末 4 g，加乙醇 50 mL，加热回流 3 h，滤过，滤液蒸干，残渣加水 15 mL，微热使溶解，加在 D101 型大孔吸附树脂柱（内径 1.5 cm，柱高 15 cm）上，用水 100 mL 洗脱，弃去水液，再用 20%乙醇 100 mL 洗脱，弃去洗脱液，继续用 80%乙醇 100 mL 洗脱，收集该洗脱液，蒸干，残渣加 80%甲醇溶解定容至 1 mL，作为供试品溶液；另取红牛膝对照药材 4 g，同法制成对照药材溶液；再取β-蜕皮甾酮对照品、人参皂苷 R_O 对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的混合溶液，作为对照品溶液。照薄层色谱法（《中国药典》2015 年版四部通则 0502）试验，吸取供试品溶液和对照药材溶液各 2 μL、对照品溶液 1 μL，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸(8:2:1:0.2)为展开剂，展开，取出，晾干，喷以 10%硫酸乙醇溶液，在 105℃加热至斑点清晰，置紫外光灯(365 nm)下检视。

1.3.4 β-蜕皮甾酮含量测定

色谱条件如下。色谱柱：飞诺美菲罗门 Gemini-NX C_{18} 色谱柱；流动相：乙腈-水溶液（15∶85）；柱温：25 ℃；流速：1.0 mL·min^{-1}；检测波长：243 nm；进样量：10 μL。理论板数按β-蜕皮甾酮计算不低于 2000。

对照品溶液的制备：取β-蜕皮甾酮对照品适量，精密称定，加甲醇制成每 1 mL 含 50 μg 的溶液，作为对照品溶液。

供试品溶液的制备：采用 $L_9(3^4)$正交试验表，考察提取溶剂用量（10 mL、20 mL、30 mL）、加热回流提取时间（30、60、90 min）及甲醇浓度(60%、80%、100%)对红牛膝药材中β-蜕皮甾酮含量提取得率的影响。取红牛膝药材粉末（过二号筛）1 g，精密称定，按表 2 进行供试品制备，放置室温，称重，用相应浓度的甲醇补足减失的重量，摇匀，用微孔滤膜滤过，弃去初滤液，取续滤液，进样分析。根据正交结果筛选最合适的供试品溶液制备方法。

表 2　红牛膝中β-蜕皮甾酮含量测定工艺因素水平表

Table 2　Process factor level table for β-ecdysterone content determination in *Achyranthes longifolia*

水平 Level	A 溶剂用量 Solvent volume (mL)	B 加热回流提取时间 Extraction time (min)	C 甲醇浓度 Concentration of methanol (%)
1	10	30	60
2	20	60	80
3	30	90	100

专属性试验　分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，测定。同时做溶剂空白。

线性关系考察　取β-蜕皮甾酮对照品适量，精密称定，加甲醇制成浓度为 560.6 μg.mL^{-1} 的溶液。分别精密吸取以上对照品溶液 0.1、0.2、1、2、4 mL 置于 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，摇匀，作为标准曲线的系列溶液，按上述色谱条件进行分析，以对照品的进样量(μg)为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

精密度试验　精密称取红牛膝样品（编号：10），制成供试品溶液，连续进样测定 6 次，记录β-蜕皮甾酮峰面积并计算相对标准偏差(relative standard deviation，RSD)。

重复性试验　精密称取红牛膝样品（编号：10）粉末 6 份，制成供试品溶液，测定β-蜕皮甾酮含量。

稳定性试验　取同一份供试品溶液（编号：10），在 0、1、6、12、18、24 h 进样测定，记录β-蜕皮甾酮峰面积并计算相对标准偏差(RSD)。

加样回收率试验　取已知含量的红牛膝样品（编号：10）粉末 6 份，各 0.5 g,精密称定，置具塞锥形瓶中，各精密加入上述β-蜕皮甾酮对照品溶液 560.6 μg.mL^{-1} 1 mL，另精密加入甲醇 19 mL,制成供试品溶液，测定β-蜕皮甾酮含量，计算回收率及 RSD 值。

耐用性试验　分别采用 Gemini-NX C_{18}、Amethyst C_{18}-H 和依利特 C_{18} 三根不同品牌的色谱柱(规格均为 5 μm，4.6 mm×250 mm）测定样品（编号：10）中β-蜕皮甾酮的含量，计算 RSD 值。采用 Agilent 1260 和岛津 LC 20AT 两个不同品牌的色谱仪，测定样品（编号：10）中β-蜕皮甾酮的含量，计算 RAD 值。

14 批红牛膝药材样品含量测定：根据上述供试品溶液制备条件项下正交试验结果确定的方法，制备 14 批红牛膝药材样品的供试品溶液；根据上述色谱条件及测定方法测定 14 批红牛膝药材样品的β-蜕皮甾酮含量（以药材干燥品计算）。

2 结果与分析

2.1 性状鉴别

经对不同产地红牛膝药材性状进行观察，归纳总结出其药材性状如下：根茎短粗，长 2～6 cm，直径 1～1.5 cm，上部有数个凹窝状茎痕或残留茎基，下部簇生根 4～9 条或更多。根呈圆柱形，常扭曲，长 10～20 cm，直径 0.4～1.2 cm，向下渐细。表面灰黄褐色至棕褐色，具细密的纵皱纹及须根除去后的痕迹。质硬而稍有弹性，易折断，断面皮部淡灰褐色，略光亮，可见多数点状散布的维管束。气微，味微甜、微涩（图 2）。



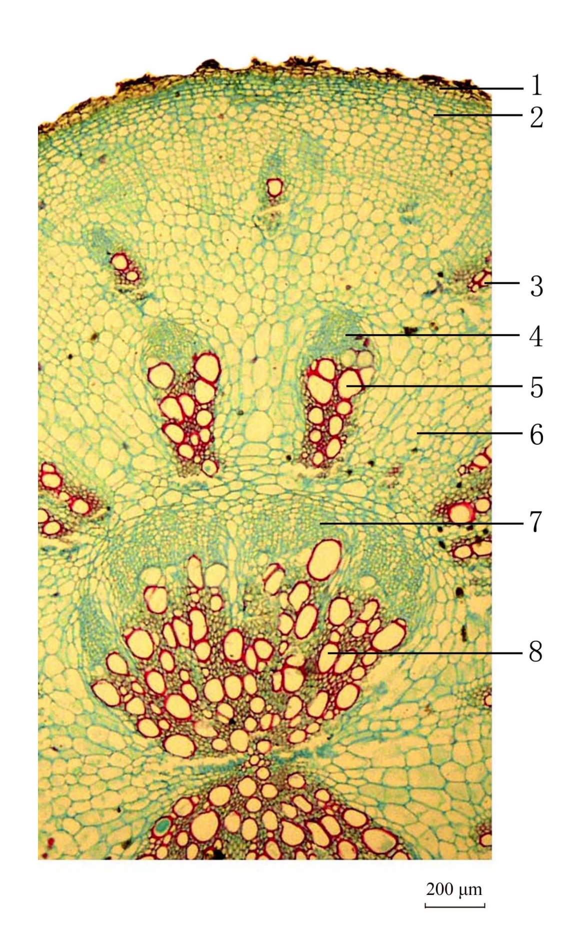
图 2　红牛膝药材图

Fig.2　Materia medica of *Achyranthes longifolia*

2.2 显微鉴别

经对不同产地红牛膝药材横切面和粉末的显微进行观察，归纳总结出其药材显微特征如下。

2.2.1 根横切面特征　木栓层细胞 2～5 列，部分已经脱落。栓内层细胞数列，类圆形。维管束外韧型，束间形成层不明显；异型维管束断续排列成 3～5 轮同心环，外部的维管束较小，木质部导管 1～5 个，向内维管束较大，导管较多；中央正常维管束，初生木质部二原型，导管单个或几个相连放射状分布，直径 30～185 μm，射线细胞 5～10 余列。薄壁细胞中含草酸钙砂晶或方晶，直径 3～28 μm（图 3）。



1. 木栓层；**2**. 皮层；**3**. 维管束；**4**. 韧皮部；**5**. 木质部；**6**. 射线；**7**. 中心韧皮部；**8**. 中心木质部。

1. Suberin lamellae; **2**. Cortex; **3**. Vascular bundle; **4**. Phloem; **5**. Xylem; **6**. Ray; **7**. Central phloem; **8**. Central xylem.

图 3　红牛膝根横切面

Fig.3　Transverse section of *Achyranthes longifolia* root

2.2.2 根的粉末鉴别

红牛膝根粉末灰黄色。木纤维较长，壁微木化，胞腔大，有的具斜形单纹孔，纤维直径 12~28 μm；导管为网纹或梯纹导管，直径 25~58 μm；草酸钙砂晶或方晶多散在，直径 3~15 μm；木栓细胞多角形或类方形，灰黄色（图 4）。



1. 导管；**2**. 纤维；**3**. 草酸钙砂晶；**4**. 木栓细胞。

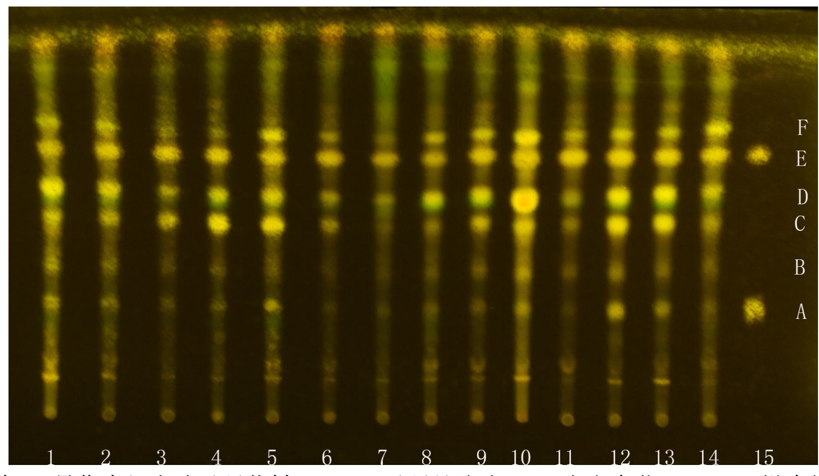
1. Vessel; **2**. Fibre; **3**. Calcium oxalate sand crystal; **4**. Phellem cell.

图 4　粉末显微图

Fig.4　Powder micrograph

2.3 薄层色谱鉴别

供试品色谱中，在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的荧光斑点。见图5。



1～14. 红牛膝药材（8 号作为红牛膝对照药材）；**15**. 对照品溶液（**A**. 人参皂苷 R_0；**E**. *β*-蜕皮甾酮）；**A-F**. 特征荧光斑点。

1−14. *Achyranthes longifolia* materials (No. 8 is the reference materials of *Achyranthes longifolia*); **15**. Mixed reference substance (**A**. Ginsenoside R_0; **E**. *β*- Ecdysterone); **A-F**. Characteristic fluorescent spots.

图 5　红牛膝药材 TLC 色谱图

Fig.5　TLC chromatogram of *Achyranthes longifolia*

2.4 方法学考察和含量测定

2.4.1 供试品溶液制备方法的确定　试验结果表明，溶剂用量（A）、加热回流提取时间（B)、甲醇浓度(C) 3 个因素对*β*-蜕皮甾酮得率的差异均无统计学意义（*P* 均>0.05），其中 D 为空白列。经高效液相色谱分析发现，甲醇浓度为 60%和 80%时，样品检出的色谱峰较多，容易干扰到*β*-蜕皮甾酮分离测定；溶剂用量少，过滤时挥发易造成测定结果误差变大；提取时间过短，测得结果稍低，提取时间过长，易导致效率低下。综合以上因素，最终选择 $A_2B_2C_3$ 作为提取工艺，即取红牛膝药材粉末（过二号筛）1 g，精密称定，精密加入甲醇 20 mL，称定重量，加热回流 60 min，放至室温，再称定重量，用甲醇补足减失的重量，摇匀，用微孔滤膜滤过，弃去初滤液，取续滤液，作为供试品溶液。结果见表 3 和表 4。

前期预实验在 C 因素水平不变的情况下，因素 A 与因素 B 的不同水平间的交互作用曲线趋于平行，没有相交；在 A 因素水平不变的情况下，因素 B 与因素 C 的不同水平间的交互作用曲线趋于平行，没有相交。因此，本研究没有考虑不同因素间的交互作用。

表 3　红牛膝中*β*-蜕皮甾酮含量测定正交试验结果与分析

Table 3　Results and analysis of orthogonal test for *β*-ecdysterone content determination in *Achyranthes longifolia*

编号 No.	因素 Factor				评价指标 Evaluation index
	A	B	C	D	*β*-蜕皮甾酮 *β*-ecdysterone ($mg.g^{-1}$)
1	1	1	1	1	1.034 6
2	1	2	2	2	1.019 8
3	1	3	3	3	0.929 8

4	2	1	2	3	1.013 8
5	2	2	3	1	0.910 4
6	2	3	1	2	1.010 0
7	3	1	3	2	0.841 8
8	3	2	1	3	0.983 3
9	3	3	2	1	1.051 7
K1	2.984 2	2.890 2	3.027 9	2.996 7	
K2	2.934 2	2.913 5	3.085 3	2.871 6	
K3	2.876 8	2.991 5	2.682 0	2.926 9	
平均值 K1 Average K1	0.994 7	0.963 4	1.009 3	0.998 9	
平均值 K2 Average K2	0.978 1	0.971 2	1.028 4	0.957 2	
平均值 K3 Average K3	0.958 9	0.997 2	0.894 0	0.975 6	
R	0.035 8	0.033 8	0.134 4	0.041 7	

表 4　*β*-蜕皮甾酮方差分析结果

Table 4　Analysis of variance results of *β*-ecdysterone

变异来源 Source of variation	离均差平方和 Sum of squares of deviation from mean	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square (MS)	*F*	*P*
溶剂用量 Solvent volume (mL)	1.925 5E-03	2	9.627 5E-04	0.847 2	>0.05
加热回流提取时间 Extraction time (min)	1.876 5E-03	2	9.382 5E-04	0.825 7	>0.05
甲醇浓度 Concentration of methanol (%)	3.173 2E-02	2	1.586 6E-02	13.962 1	>0.05
误差 Error	2.620 0E-03	2			
误差 Error	4.545 5E-03	2			
总计 Total	3.815 5E-02	2			

2.4.2 专属性试验　溶剂空白、对照品溶液和供试品溶液色谱图见图 6。供试品溶液色谱图中欲测成分*β*-蜕皮甾酮色谱峰与其他杂质峰分离较好，分离度大于 1.5；二极管阵列检测器纯度分析显示，欲测成分*β*-蜕皮甾酮峰的纯度均大于 0.999，且均大于其单点阈值，说明该色谱峰纯度较高；溶剂空白无干扰。表明专属性良好。

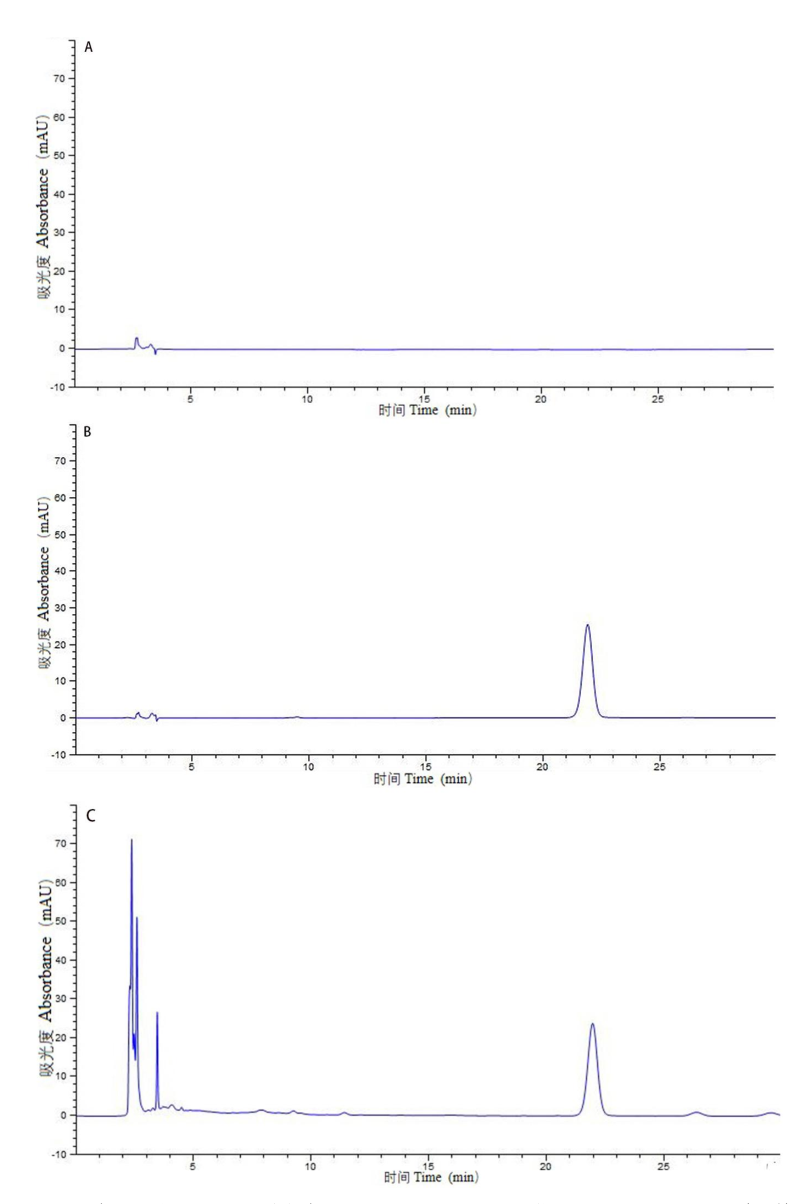


图 6　溶剂空白(A)、β-蜕皮甾酮对照品(B)和供试品(C)HPLC 色谱图

Fig.6　Chromatogram of solvent blank (**A**)，*β*-ecdysterone reference sample (**B**) and substance (**C**)

2.4.3 线性关系考察　*β*-蜕皮甾酮对照品进样量在 5.606~224.224 μg 范围时，进样量与峰面积呈良好的线性关系，回归方程为：*y*=13.462 1*x*+5.237 7，*r*=0.999 9。

2.4.4 精密度试验　连续测定 6 次*β*-蜕皮甾酮峰面积平均值为 747，RSD＝0.41%。表明仪器的精密度良好。

2.4.5 重复性试验　6 份供试品测得*β*-蜕皮甾酮含量的平均值为 0.119%，RSD＝2.14%。表明供试品的制备方法重复性良好。

2.4.6 稳定性试验　24 h 内同一供试品溶液的*β*-蜕皮甾酮峰面积的 RSD 为 1.27%，表明样品在 24 h 内稳定。

2.4.7 加样回收率试验　6 份样品测得*β*-蜕皮甾酮平均加样回收率为 97.72%，RSD=1.37%（*n*=6）。表明方法准确度好（表 5）。

表 5　回收率试验结果

Table 5　Results of recovery test (*n*= 6)

称样量 Weighing of	*β*-蜕皮甾酮含量 *β*-ecdysterone content	加入量 Added	测得量 Detected	回收率 Recovery	平均回收率 Mean	相对标准偏差

sample (g)	(mg)	amount (mg)	amount (mg)	(%)	recovery (%)	RSD (%)
0.501 2	0.529 0	0.560 6	1.067 7	96.08	97.68	1.37
0.506 1	0.534 2	0.560 6	1.072 9	96.09		
0.501 5	0.529 3	0.560 6	1.082 4	98.66		
0.505 0	0.533 0	0.560 6	1.087 2	98.85		
0.500 1	0.527 9	0.560 6	1.074 5	97.52		
0.506 5	0.534 6	0.560 6	1.089 1	98.90		

2.4.8 耐用性试验　三根色谱柱测得含量平均值为0.120%，RSD=1.02%（n=3）；两台色谱仪测得含量平均值为0.121%，RAD=0.50%（n=2）。结果表面，该方法对不同品牌的色谱柱和液相色谱仪均具有良好的耐用性，说明该方法对不同色谱柱和不同仪器的适用性强。

2.4.9 14 批样品含量测定结果　β-蜕皮甾酮含量范围为0. 005%～0. 158%，平均值为0. 098%（表6）。根据测定结果，并考虑不同产地药材来源差异情况，拟定红牛膝药材中β-蜕皮甾酮含量限度为≥0.050%。

表 6　14 批红牛膝药材样品含量测定结果

Table 6　Content determination results of fourteen batches of samples（n = 2）

编号 No.	β-蜕皮甾酮含量 β-ecdysterone content (%)	编号 No.	β-蜕皮甾酮含量 β-ecdysterone content (%)
1	0.005	8	0.058
2	0.083	9	0.056
3	0.158	10	0.119
4	0.137	11	0.068
5	0.075	12	0.140
6	0.098	13	0.120
7	0.104	14	0.110

3 讨论

民族药质量标准是民族药发展的重要因素，标准化是民族药发展的趋势。由于历史原因，过去民族药标准化工作虽取得了一定的成绩，但整体水平偏低，无法满足临床用药的质量安全和民族药产品的开发需求。因此，开展和提高民族药质量标准的研究，对于规范民族药资源开发、生产、流通、民族药产品质量的稳定、临床用药具有重要意义，也为监管提供技术依据。

薄层色谱鉴别研究中，β-蜕皮甾酮、人参皂苷 R_O 在样品中含量较高，专属性强，作为特征性成分。选用不同的薄层板（硅胶H薄层板，高效硅胶H薄层板、硅胶G薄层板、高效硅胶G薄层板），经过比较发现硅胶 G 薄层板展开效果较好，特征成分斑点分离效果较好，条带比较清晰，所以采用硅胶 G 薄层板；展开剂比较了乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸（8:2:1:0.2）、正丁醇-乙酸乙酯-甲酸-水（6:4:1:5）的上层溶液，发现采用乙酸乙酯-甲醇-水-甲酸（8:2:1:0.2）作为展开剂，分离效果良好，样品在与对照药材和β-蜕皮甾酮、人参皂苷 R_O 相应位置上显相同颜色的斑点，重复性良好，专属性强。同时考察了不同品牌的硅胶 G 薄层板，并在不同温度（4 ℃和 30 ℃）和不同湿度（相对湿度 55%和 88%）下试验，特征成分斑点分离效果均较好，方法耐用性好。上述方法可作为红牛膝鉴别的主要依据。

β-蜕皮甾酮为红牛膝主要有效成分之一，为了更全面地反应饮片质量，本研究测定β-蜕皮甾酮含量。在 HPLC 进行含量测定方法研究中，笔者曾对加热回流提取和超声提取制备供试液β-蜕皮甾

酮含量进行比较，结果表明加热回流提取液测得的β-蜕皮甾酮含量高于超声提取；还分别对甲醇和乙醇作为提取溶剂分别加热回流提取制备供试液β-蜕皮甾酮含量进行比较，结果甲醇提取液β-蜕皮甾酮含量较乙醇提取液高。故本方法采用甲醇加热回流的方法制备供试品溶液。方法学研究表明，本文建立的红牛膝中β-蜕皮甾酮测定方法专属性强，无溶剂干扰，精密度和准确度高，具有良好的重复性和重现性，可用于评价瑶药红牛膝质量的优劣。

本研究考察了红牛膝的性状鉴别、显微鉴别、薄层鉴别、含量等检查项目，并建立了红牛膝中β-蜕皮甾酮 HPLC 含量测定方法，可为红牛膝质量标准的完善与提高提供依据，为红牛膝的质量控制和开发应用提供了参考。

参考文献：

GORELICK-FELDMAN J, MACLEAN D, ILIC N, et al., 2008. Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells[J]. J Agric Food Chem, 56(10): 3532-3537.

Jiangxi Provincial Food and Drug Administration, 2009. Preparation standards for traditional chinese medicine slices in Jiangxi Province, 2008 Edition[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press: 77-78. [江西省食品药品监督管理局，2009. 江西省中药饮片炮制规范 2008 年版[M]. 上海：上海科学技术出版社：77-78.]

LAN M, 1959. Herbal medicines of Southern Yunnan[M]. Kunming: Yunnan People's Publishing House: 156-158. [兰茂，1959. 滇南本草[M]. 昆明：云南人民出版社：156-158.]

LIN CR, XU WB, HUANG YS, et al., 2016. The important medicinal plant of Yao traditional medicinal market during Dragon Boat Festival in Gongcheng, Guangxi[M]. Nanning: Guangxi Science & Technology Press: 184. [林春蕊，许为斌，黄俞淞，等，2016. 广西恭城瑶族端午药市药用植物资源[M]. 南宁：广西科学技术出版社：184.]

Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2006. Dictionary of traditional Chinese medicine [M]. 2nd ed. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press: 114-116. [南京中医药大学，2006. 中药大辞典[M]. 2 版.上海：上海科学技术出版社：114-116.]

QIN HN, LIU Y, 2010. A checklist of vascular plants of Guangxi[M]. Beijing: Science Press: 101. [覃海宁，刘演，2010. 广西植物名录[M]. 北京：科学出版社：101.]

QIN XY, LUO JY, GAO ZG, 2002. Chinese Yao Pharmacy[M]. Beijing: The Ethenic Publishing House: 738-739. [覃迅云，罗金裕，高志刚，2002.中国瑶药学[M]. 北京：民族出版社:738-739.]

TANG YH, XIN DW, LI GS, et al., 2019. Effects of β-Ecdysterone on serum biochemical indexes of bone metabolism and bone mineral density in rats with glucocorticoid osteoporosis[J]. J Wenzhou Med Univ, 49(2): 100-103. [汤样华，辛大伟，李国松，等，2019. β-蜕皮甾酮对激素性骨质疏松大鼠血清骨代谢指标及骨密度的影响[J]. 温州医科大学学报，49(2)：100-103.]

The State Administration of Traditional Chinese Medicine Chinese Herbal Medicine Editi, 1999. Chinese herbal medicine[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2: 836-839. [国家中医药管理局中华本草编委会，1999. 中华本草[M]. 上海：上海科学技术出版社，2：836-839.]

WANG JF, 2017. Pharmacognostic study on *Cyathula capitata* (Wall.) Moq.[D]. Chengdu: Southwest Minzu University, P. R. China. [王景富，2017. 彝药材红牛膝生药学研究[D]. 成都：西南民族大学.]

WU X, 2006. The molecular machanisms of endothelial protection by ecdysterone[D]. Guangzhou: First Military Medical University. [吴旭，2006. 蜕皮甾酮的内皮保护作用及其机理研究[D]. 广州：第一军医大学.]

WU X, ZHAO Z, ZHANG JH, et al., 2002. Effect of ecdysterone on arrhythmia induced by myocardium reperfusion[J]. Pharm J Chin PLA, 18(1): 1-3. [吴旭，赵忠，张军花，等，2002. 蜕皮甾酮对大鼠心肌再灌注诱发心律失常的影响[J]. 解放军药学学报，18(1)：1-3.]

XIA XC, ZHANG QY, LIANG GN, et al., 2013. Role of 20-hydroxyecdysone in protecting rats against diabetic cardiomyopathy[J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 15(4): 412-415. [夏西超，张庆远，梁桂娜，等，2013. 20-羟基蜕皮甾酮对大鼠糖尿病心肌病的保护作用[J].中华老年心脑血管病杂志，15(4)：412-415.]

XIAO PG, 2002. Modern Chinese materia medica[M]. Beijing: Chemical Industry Publishing: 198. [肖培根，2002. 新编中药志[M]. 北京：化学工业出版社：198.]

YU DY, LV XC, SHI LY, et al., 2011. Inhibitory effect of triterpenoidal saponins from *Achyranthes bidentata* Bl. on osteoclast differentiation[J]. Chin J Trad Med Traumatol Orthop, 19(3): 9-10. [于大永，吕晓超，史丽颖，等,2011. 牛膝中三萜皂苷抑制破骨细胞分化作用的研究[J]. 中国中医骨伤科杂志，19(3)：9-10.]

ZHAO Q, 2021. The experimental study of *β*-ecdysterone promoting proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells through the Wnt/*β*-catenin signaling pathway[D]. Nanchong:North Sichuan Medical College. [赵强，2021. *β*-蜕皮甾酮通过 Wnt/*β*-catenin 信号通路促进 MC3T3-E1 细胞增殖、分化的实验研究[D]. 南充：川北医学院.]

ZHANG QY, XIA XC, WANG ZX, et al., 2015. Effect of 20-hydroxyecdysone on glucokinase and tumor necrosis factor-*α* in type I diabetes mellitus of mice[J]. Mod Prev Med, 42(16): 2989-2992. [张庆远，夏西超，王中晓，等，2015. 20-羟基蜕皮甾酮对I型糖尿病小鼠葡萄糖激酶和肿瘤坏死因子-*α*表达的影响[J]. 现代预防医学，42(16)：2989-2992.]

ZHANG Y, ZHANG SZY, WANG LB, et al., 2022. The study of Niuxi-Duzhong active mononer combination in preventing glucocorticoid-induce doste oporosis mice[J]. Chin J Osteoporosis, 28(5): 643-647. [章喻，张孙正远，王利波，等，2022. 牛膝-杜仲成分组合干预糖皮质激素性骨质疏松模型小鼠的研究[J]. 中国骨质疏松杂志，28(5)：643-647.]